

明 細 書

新規化合物および医薬組成物

技術分野

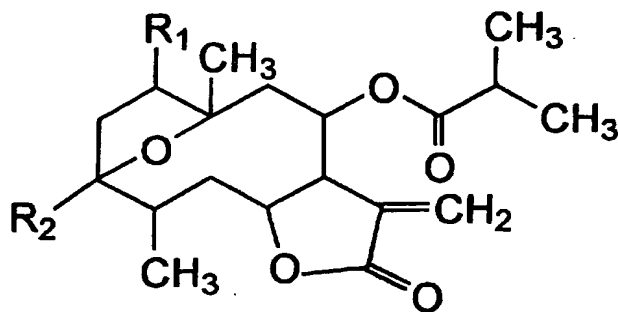
[0001] 本発明は、新規化合物、特に、キク科植物またはアカバナ科チョウジタデ属植物から抽出単離された新規化合物およびその用途に関する。また、本発明はキク科植物またはアカバナ科チョウジタデ属植物から抽出単離された既知物質の医薬用途に関する。

背景技術

[0002] キク科植物またはアカバナ科チョウジタデ属植物、特に、ニトベギクは、皮膚病(水虫病)、肝炎、黄疸、膀胱炎を抑制する等の薬理効果を有するものとして知られている。例えば、特許第2609780号公報および特願平8-127538号公報によれば、ニトベギクを煎じたものまたはその抽出エキスをを用いた糖尿病治療薬が提案されている。

[0003] また、ニトベギク抽出物から単離された化合物と同一の化合物が文献に開示されている。例えば、Raghwendra Pal, et al. Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemical Including Medicinal Chemistry, 14B, 259 - 262 (1976)、Raghwendra Pal, et al. Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemical Including Medicinal Chemistry, 15B, 208 - 211 (1977)、Schuster A, et al. Phytochemistry, 31, 3139 - 3141 (1992)には、これらの文献順に、下記の一般式(I)で表される化合物:

[化1]



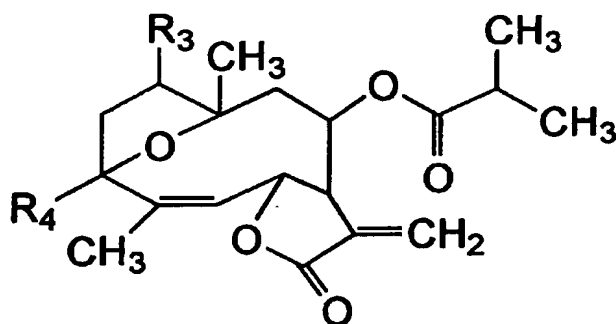
(I)

において、 R_1 および R_2 が水酸基を示す化合物(以下、「TD-7」という)、 R_1 が水素原子を示し R_2 が水酸基を示す化合物(以下、「TD-9」という)、 R_1 が水素原子を示し R_2 がメキシ基を示す化合物(以下、「TD-10」という)が開示されている。

[0004] Paulo Sergio Pereira, et al. Phytochemistry, 45, 1445-1448 (1997)、C. Zdero et al. Phytochemistry, 26, 1999 - 2006 (1987)には、下記の一般式(II)で表される化合物

:

[化2]

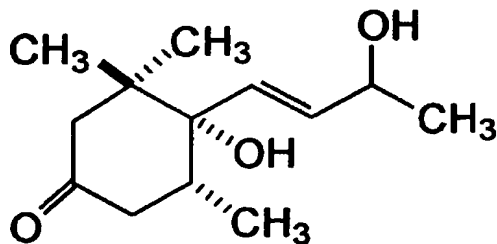


(II)

において、 R_3 および R_4 がメキシ基を示す化合物(以下、「TD-1」という)、 R_3 がメキシ基を示し R_4 が水酸基を示す化合物(以下、「TD-4」という)が開示されている。

[0005] Baruah Nabin C., et al. Journal of Organic Chemistry, 44, 1831 - 1835 (1979)には、下記の一般式(IV) :

[化3]

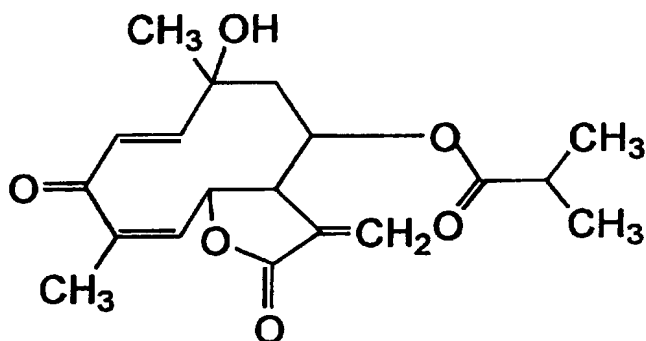


(III)

で表される化合物(以下、「TD-2」という)が開示されている。

Baruah Nabin C., et al. Journal of Organic Chemistry, 44, 1831 - 1835 (1979)には、下記の一般式(V)：

[化4]



(IV)

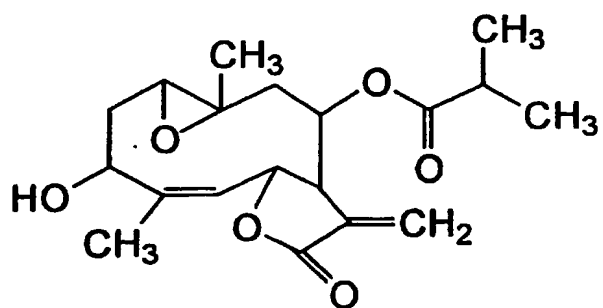
で表される化合物(以下、「TD-8」という)が開示されている。

Antonia G. Gonzalez, et al, Journal of Natural Products, 57, 400 - 402 (1994)では、(4S, 5R)-4-hydroxy-4-[(1E, 3R)-3-hydroxy-1-butenyl]-3, 3, 5-trimethyl-cyclohexanone)が開示されている。

[0006] 一方、Raghwendra Pal., et al. Journal of Phamaceutical Science, 65, 918 - 920 (1976)では、ニトベギクの抽出液からタギチニン(Tagitinin) A-Fが単離されたとの報告、およびこれら化合物中で、タギチニンFのみがP388マウス白血病を腹腔内移植したマウスに対して延命効果を与えたとの報告がなされている。ここで、タギチニンAはTD-7に、タギチニンCはTD-2に、タギチニンDはTD-9に、タギチニンEはTD-8にそれぞれ相当するものであるが、タギチニンFは本願発明におけるTD-1-10に相当するものではない。

[0007] また、Raghwendra Pal, et al. Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry, 15B, 208-211 (1977)には、下記の一般式(VI)：

[化5]

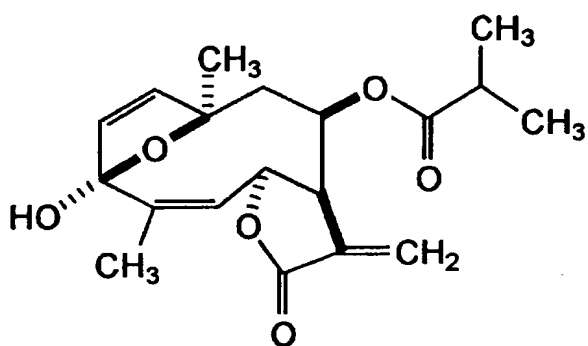


(V)

で表される化合物(以下、「TD-11」という)が開示されている。

Isao Agata, et al. Yakugaku zasshi, 101, 1067-1071 (1981)には、下記の一般式(V II) :

[化6]

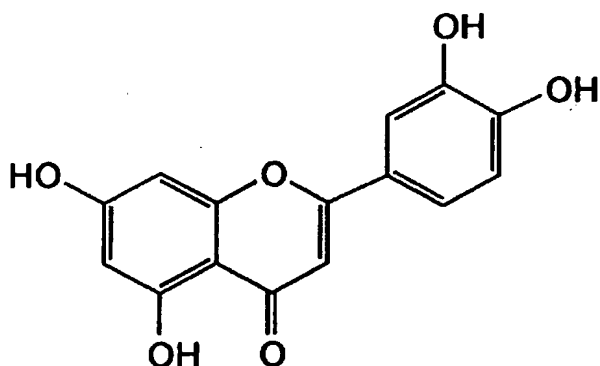


(VI)

で表される化合物(以下、「TD-12」という)が開示されている。

S. Shibata, et al. Yakugaku Zasshi, 80, 620-624 (1960)には、下記の一般式(VIII) :

[化7]

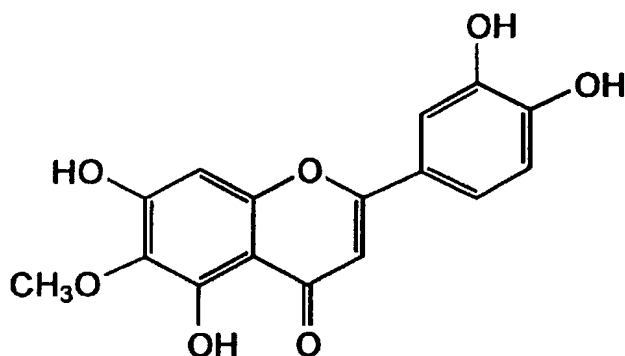


(VII)

で表される化合物(以下、「TD-13」という)が開示されている。

Christa Zdero, et al. Phytochemistry, 26, 1999-2006 (1987)には、下記の一般式(I X):

[化8]



(VIII)

で表される化合物(以下、「TD-14」という)が開示されている。

[0008] しかしながら、キク科植物またはアカバナ科チョウジタデ属植物中には未知化合物が存在しており、これら化合物の同定が切望されている。また、これら植物から抽出単離された既知、未知の化合物の新たな用途(薬理効果等)についても解明することが急務とされている。

[文 献]

特許文献1:特許2609780号(日本国)

特許文献2:特願平8-127538号(日本国)

技術文献1:Raghwendra Pal, et al. Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemical Including Medicinal Chemistry, 14B, 259 - 262 (1976)。

技術文献2:Raghwendra Pal, et al. Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemical Including Medicinal Chemistry, 15B, 208 - 211 (1977)。

技術文献3:Schuster A, et al. Phytochemistry, 31, 3139 - 3141 (1992)。

技術文献4:Paulo Sergio Pereira, et al. Phytochemistry, 45, 1445 - 1448 (1997)。

。

技術文献5:C. Zdero et al. Phytochemistry, 26, 1999 - 2006 (1987)。

技術文献6:Raghwendra Pal, et al. Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemical Including Medicinal Chemistry, 15B, 208 - 211 (1977)。

技術文献7:Baruah Nabin C, et al. Journal of Organic Chemistry, 44, 1831 - 1835 (1979)。

技術文献8:Antonia G. Gonzalez, et al, Journal of Natural Products, 57, 400 - 402 (1994)

技術文献9:Raghwendra Pal, et al. Journal of Pharmaceutical Science, 65, 918 - 920 (1976)。

技術文献10:Raghwendra Pal, et al. Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry, 15B, 208-211 (1977)

技術文献11:Isao Agata, et al. Yakugaku zasshi, 101, 1067-1071 (1981)

技術文献12:S. Shibata, et al. Yakugaku Zasshi, 80, 620-624 (1960)

技術文献13:Christa Zdero, et al. Phytochemistry, 26, 1999-2006 (1987)

発明の概要

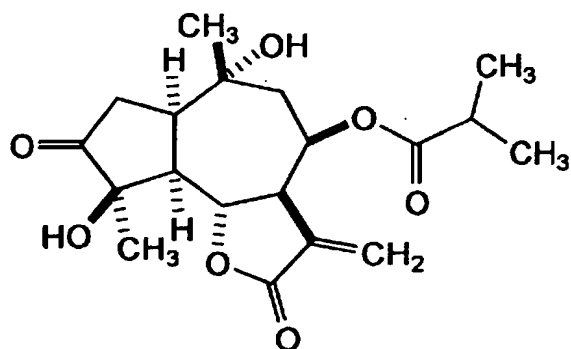
[0009] 本発明者等は、今般、抗癌作用を有する新規化合物と、既知化合物が特定の癌細胞に対して抗癌作用を有することを見出した。本発明はかかる知見によるものである。従って、本発明は、新規化合物と、特定の癌に対して抗癌性を有する既知化合物の医薬用途を提供するものである。

本発明の第一の態様

本発明の第一の態様によれば、新規化合物を提供でき、その化合物は下記の一般式で表されるものである。

下記の一般式(I)：

[化9]

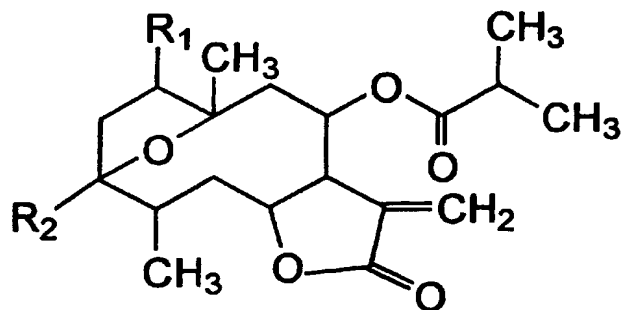


(IX)

[上記式中、 R_1 は水酸基を示し、 R_2 はメキシ基を示す]
で表される化合物(以下、「TD-3」という)。

下記の一般式(II)：

[化10]

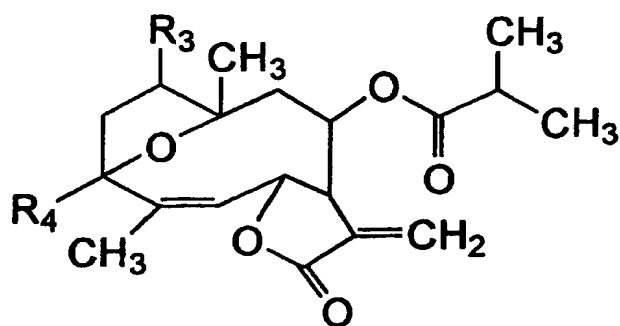


(I)

[上記式中、 R_3 は水酸基を示し、 R_4 はメキシ基を示す]
で表される化合物(以下、「TD-6」という)。

下記の一般式(III)：

[化11]



(II)

[上記式中、3-ヒドロキシ-1-ブテニル基の3-ヒドロキシ基が3S立体配座とされてなるものである]

で表される、化合物(以下、「TD-5」という)。

[0010] 本発明の第二の態様

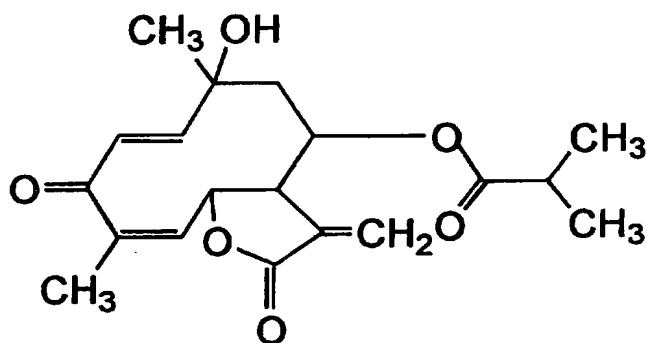
本発明の第二の態様によれば、既知である下記の一般式で表される化合物の一種または二種以上を含んでなる抗急性骨髄性白血病剤を提供することができる。

上記した一般式(I)において、R₁ および R₂ が水酸基を示す化合物(TD-7)、R₁ が水素原子を示し R₂ が水酸基を示す化合物(TD-9)、R₁ が水素原子を示し R₂ がメキシ基を示す化合物(TD-10)、

上記した一般式(II)において、R₃ および R₄ がメキシ基を示す化合物(TD-1)、R₃ がメキシ基を示し R₄ が水酸基を示す化合物(TD-4)、

下記の一般式(IV)：

[化12]

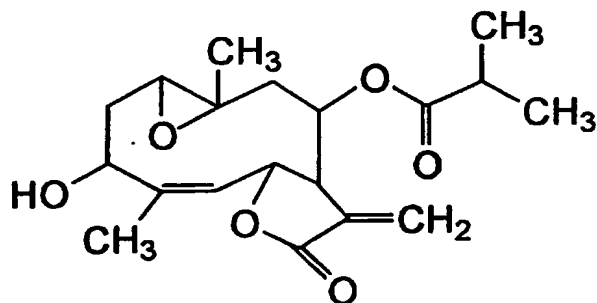


(IV)

で表される化合物(TD-2)、および

下記的一般式(V):

[化13]



(V)

で表される化合物(TD-8)。

[0011] 本発明の第三の態様

本発明の第三の態様によれば、上記一般式(II)において、 R_3 および R_4 がメキシ基を示す化合物(TD-1)を有効成分とする、抗卵巣癌剤または抗前立腺癌剤を提供することができる。また、本発明にあつては、卵巣癌または前立腺癌の治療に使用される、抗卵巣癌剤または抗前立腺癌剤が提供される。

[0012] 本発明の第四の態様

本発明の第四の態様によれば、TD-1〜TD-14を単離する方法が提案される。

発明を実施するための最良の形態

[0013] 本発明の第一の態様

本発明の第一の態様で提供する新規化合物は、上記一般式(I)において、式中、 R_1 が水酸基を示し R_2 がメキシ基を示す化合物(TD-3)、上記一般式(II)において、式中、 R_3 が水酸基を示し R_4 がメキシ基を示す化合物(TD-6)、上記一般式(III)で表される化合物(TD-5)である。

TD-5は、技術文献8に記載された化合物と立体配座が異なる異性体化合物であり、具体的には、3-ヒドロキシ-1-ブテニル基のヒドロキシ基が3S立体配座とされる新規化合物である。

[0014] 新規化合物の用途

本発明による新規化合物TD-3、TD-5およびTD-6は、免疫力の向上、新陳代謝機能の活性化、病原菌に対する滅殺および殺菌作用、過剰な炎症またはアレルギーの抑制効果、生活習慣病(糖尿病等)、免疫疾患の抑制および治癒等を付与する有効成分としての用途が考えられる。これら新規化合物の中でも、「TD-3」および「TD-6」は抗癌性が認められ、好ましくは白血病(より好ましくは急性骨髄性白血病)に抗癌性が認められる。従って、新規化合物の「TD-3」および「TD-6」は抗癌剤の有効成分とされ、この抗癌剤は癌治療に使用することができる。

- [0015] 新規化合物の「TD-3」および「TD-6」の化合物を癌療用の抗癌剤として使用するには、種々の投与形態に合わせて、これらの新規化合物を公知の医薬品用担体と組合せて製剤化することが可能である。例えば、皮下注射、静脈内注射、筋肉内注射、座薬などによる非経口投与、または錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤などによる経口投与の全身投与のほか、軟膏剤、ローション剤、座薬、エアゾール剤などの局所投与の形態を例示することができる。

投与量は、動物および人の年齢、体重、症状に合わせて適宜定めることができる。

[0016] 本発明の第二の態様

本発明の第二の態様によれば、既知化合物の一種または二種以上を含んでなる抗急性骨髄性白血病剤を提供することができる。先に説明した通り、「TD-1」、「TD-2」、「TD-4」、「TD-7」、「TD-8」、「TD-9」、「TD-10」は既知化合物である。これらの既知化合物は、動物または人(好ましい)の急性骨髄性白血病に対して優れた抑制および治療効果があることが今回の実験結果により明らかになったものである。従って、これらTD化合物はこれらを有効成分として含む抗急性骨髄性白血病剤として利用することができる。医薬品としての薬剤および投与形態等は本発明の第一の態様で説明したのと同様であってよい。

[0017] 本発明の第三の態様

本発明の第三の態様によれば、既知化合物「TD-1」を有効成分とする、抗卵巣癌剤または抗前立腺癌剤を提供することができる。TD-1は、動物または人(好ましい)の卵巣癌または前立腺癌に対して優れた抑制および治療効果があることが追加の実験結果により明らかになったものである。従って、TD-1はこれを有効成分として含む

抗卵巣癌または抗前立腺癌剤として利用することができる。医薬品としての薬剤および投与形態等は本発明の第一の態様で説明したのと同様であってよい。

[0018] 本発明の第四の態様

1) TD-1〜10を含んでなる組成物の製造方法(抽出方法)

本発明によれば、TD-1〜10を含んでなる組成物を得る方法を提案することができ、その方法は、TD-1〜10を含んでなる原料を用意し、

必要に応じて加熱下において、前記原料を溶媒で抽出し、

前記抽出物をイオン交換クロマトグラフィーに供給し、第1の低級アルコールと、第2の低級アルコールと、必要に応じて低級エステルとをこれらの順により溶媒抽出し、

前記第2の低級アルコール画分中に、TD-1〜10を含んでなる組成物を得ることを含んでなるものである。

[0019] 原料

原料は、TD-1〜10(およびTD-11〜14)を有意量含んでなるものであればいずれのものであってもよいが、好ましくはキク科植物またはアカバナ科チョウジタデ属植物が挙げられる。

キク科植物の好ましい具体例としてはニトベギク[(ティソニア・ディベルシフォリア(ヘムスル)エー、グレイ:「*Tithonia diversifolia* (Hemsl) A, Gray」、(同族としてティソニア・フラティコサ・キャンバイ・アンド・ローズ:「*Tithonia fruticosa* Canby & Rose」)、(ティソニア・スカベリマア・ベンス:「*Tithonia scaberrima* Benth」)、(ティソニア・ロンゲラディアタ(バートル)ブレイク:「*Tithonia longeradiata* (Bertol) Blake」)]等の約10種類のもの、また、メキシコヒマワリ[学名はティソニア・ロタンディフォリア(ミル)ブレイク:「*Tithonia rotundifolia* (Mill) Blake」)]が挙げられる。

アカバナ科チョウジタデ属の植物の好ましい具体例としては、キダチキンバイ[(ラドウィギア・オクトバルビス・ラーベン:「*Ludwigia octovalvis* Raven」)、チョウジタデ(ラドウィギア・プロストラータ・ロックス:「*Ludwigia prostrata* Roxb」)]が挙げられる。

[0020] 抽出手法

TD-1〜10を含んでなる原料を抽出する際に使用する溶媒の具体例としては、炭素数1〜5の低級アルコール、好ましくはエタノールを使用する。

また、第1の低級アルコールと、第2の低級アルコールとは同一または異なるものであってよいが好ましくは別のものがよい。第1の低級アルコールと第2の低級アルコールとは炭素数1〜6、好ましくは1〜3のものを挙げることができる。本発明にあっては、第1の低級アルコールがメタノールであり、第2の低級アルコールがエタノールである組合せが好ましくは挙げられる。本発明の好ましい態様によれば、このイオン交換クロマトグラフィーの抽出を迅速に行うために、第二の低級アルコールをカラム内に入れた後に、低級エステルを抽出溶媒として用いることが好ましい。溶媒抽出において、加熱してもよく、その加熱温度は−20℃以上100℃以下、好ましくは上限が80℃以下であり、下限が1℃以上である。

使用するイオン交換クロマトグラフィーはカラムにイオン交換物質（好ましくは多孔質イオン交換樹脂：例えば、三菱化学株式会社製「ダイヤイオンHP-20」）を充填したものが挙げられる。

溶媒抽出後、この溶媒を蒸発し濃縮させて抽出物としてTD-1〜10の化合物を含んでなる組成物とすることが好ましい。

[0021] 1-1) TD-1〜10の単離

本発明によれば、TD-1〜10の化合物を単離する方法を提案することができ、その方法は、TD-1〜10を含んでなる組成物を用意し、

前記組成物をクロマトグラフィーで分離することを複数回繰り返すことにより、TD-1〜10の化合物を得るものである。

[0022] 本発明の好ましい態様によれば、TD-1〜10を含んでなる組成物は先に説明したTD-1〜10を含んでなる組成物の製造方法で得たものを利用することが好ましい。分離溶媒は、水、アセトン、クロロホルム、炭素数5以下の低級アルコール、炭素数5以下の低級エステル、およびこれらの混合溶媒を使用することができる。使用するクロマトグラフィーは順相、逆相のものであってよく、充填剤として多孔質物質（好ましくはシリカゲル）を使用してよい。さらに、（高速）液体クロマトグラフィーを使用することができる。本発明にあっては、これらクロマトグラフィーの組合せによって、TD化合物を単離することが好ましい。

[0023] 本発明によるTD-1〜10の化合物を単離する方法の具体例は、下記の方法が挙

げられる。従って、カラム充填剤、クロマトグラフィー、抽出溶媒等は先のTD化合物の単離方法で説明したのと同様であってよい。

1-2) TD-1-10を含む組成物の分画

本発明によれば、TD-1-10を含む組成物からTD-1-8を含む第1の組成物と、TD-9および10を含む第2の組成物それぞれに分離する方法を提供することができる、その方法は、TD-1-10を含んでなる組成物を順相カラムクロマトグラフィー、次いで逆相カラムクロマトグラフィーで分離し、TD-1-8を含む第1の組成物と、TD-9および10を含む第2の組成物の二種に分離するものである。

- [0024] 本発明によれば、TD-1-8を含む第1の組成物と、TD-9および10を含む第2の組成物から、TD-1-10をそれぞれ単離する方法が提供される。具体的には以下の通りである。

1-3) TD-1、2、4および5の単離

TD-1-8を含む第1の組成物を順相または逆相の(シリカゲル)カラムクロマトグラフィーを繰り返し行い、さらに(高速)液体クロマトグラフィーを行うことで、TD-1、TD-2、TD-4、TD-5をそれぞれ単離することができる。

本発明のより好ましい態様によれば、TD-1-8を含む第1の組成物を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相シリカゲルカラムを装着した高速液体クロマトグラフィーにより、順次分離精製することにより、TD-1、TD-2、TD-4、TD-5をそれぞれ単離することができる。

- [0025] 1-4) TD-3および7の単離

TD-1-8を含む第1の組成物を順相または逆相のシリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返し行い、TD-3および7をそれぞれ単離することができる。

本発明のより好ましい態様によれば、TD-1-8を含む第1の組成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、順次分離精製することにより、TD-3およびTD-7をそれぞれ単離することができる。

- [0026] 1-5) TD-6および8の単離

TD-1-8を含む第1の組成物を順相または逆相のシリカゲルカラムクロマトグラフ

イーを繰り返し行い、TD-6および8をそれぞれ単離することができる。

本発明のより好ましい態様によれば、TD-1〜8を含む第1の組成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、順次分離精製することにより、TD-6およびTD-8をそれぞれ単離することができる。

[0027] 1-6) TD-9および10の単離

TD-9および10を含んでなる第2の組成物を順相または逆相のシリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返し行い、TD-9および10をそれぞれ単離することができる。本発明のより好ましい態様によれば、TD-9および10を含んでなる第2の組成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより順次精製することにより、TD-9およびTD-10をそれぞれ単離することができる。

[0028] 2) TD-11〜14を含んでなる組成物の製造方法(抽出)

TD-11〜14を含んでなる組成物の製造方法は、1) TD-1〜10を含んでなる組成物の製造方法(抽出方法)の項で説明したのと同様であって良い。よって、この1)の項で説明した原料および抽出方法はTD-11〜14を含んでなる組成物の製造方法においても同様であってよい。また、この製造方法により、TD-11〜14はTD-1〜10と混合された組成物として得られるものであってよい。

[0029] 2-1) TD-11〜14の単離

本発明によれば、TD-11〜14の化合物を単離する方法を提案することができ、その方法は、TD-11〜14を含んでなる組成物を用意し、

前記組成物をクロマトグラフィーで分離することを複数回繰り返すことにより、TD-11〜14の化合物を得るものである。

本発明にあつては、TD-11〜14の単離はTD-1〜10の単離で説明したのと同様であつて良い。また、この単離により、TD-11〜14はTD-1〜10と混合された組成物として得られるものであってよい。

[0030] 2-2) TD-11〜14を含む組成物の分画

本発明によれば、TD-11〜14を含む組成物からTD-11とTD-14を含む第3の

組成物と、TD-12およびTD-13を含む第4の組成物それぞれに分離する方法を提供することができる。その方法は、TD-11-14を含んでなる組成物を順相カラムクロマトグラフィー、次いで逆相カラムクロマトグラフィーで分離し、TD-11と14を含む第3の組成物と、TD-12および13を含む第4の組成物に分離するものである。

[0031] 本発明の好ましい態様によれば、TD-1-TD-14を含む組成物を用いて第1の組成物-第4の組成物を得る方法が提案される。この方法は、1-2) TD-1-10を含む組成物の分画と、2-2) TD-11-14を含む組成物の分画と同様の手法で行うことができる。具体的には、TD-1-TD-14を含んでなる組成物を順相カラムクロマトグラフィー、次いで逆相カラムクロマトグラフィーで分離することにより、TD-1-8を含む第1の組成物と、TD-9および10を含む第2の組成物と、TD-11とTD-14を含む第3の組成物と、TD-12およびTD-13を含む第4の組成物をそれぞれ分離することができる。本発明の好ましい態様によれば、これら第1の組成物-第4の組成物を用いて、上記または後記する方法を用いて、TD-1-TD-14をそれぞれ単離することができる。

[0032] 2-3) TD-11および14の単離

TD-11および14を含んでなる第3の組成物を順相または逆相のシリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返し行い、TD-11および14をそれぞれ単離することができる。本発明のより好ましい態様によれば、TD-11および14を含んでなる第3の組成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、順次分離精製することにより、TD-11およびTD-14をそれぞれ単離することができる。

[0033] 2-4) TD-12および13の単離

TD-12および13を含んでなる第4の組成物を順相または逆相のシリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返し行い、TD-12および13をそれぞれ単離することができる。本発明のより好ましい態様によれば、TD-12および13を含んでなる第4の組成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより順次精製することにより、TD-12および13をそれぞれ単離することができる。

[0034] 実施例TD-1〜14の化合物の抽出および分画

ニトベギク(ティソニア・ディベルシフォリア(ヘムスル)エー、グレイ)の地上部分を乾燥した粉末3.0kgを80%エタノール45リットルで65℃、2時間加熱抽出後、濾過し不純物を取り除いた後に溶媒を除去し濃縮エキスをとした。

この濃縮エキス(320g)をイオン交換カラムクロマトグラフィー(イオン交換剤:ダイアイオンHP-20)に充填した。次に、第1のアルコール溶媒(メタノール:水の比率が50%以上)を流し、次に、第2のアルコール溶媒(80%エタノール)45リットルを流し、最後に低級エステルである酢酸エチルを流して、65℃、2時間加温抽出し、第2のアルコール画分を得た。この第2のアルコール画分を濾過し不純物を除去した後に第2のアルコール溶媒を蒸発させて濃縮した抽出物を得た。

次に、この抽出物(320g)を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルムとメタノールの比率が9:1の溶媒)、次いで逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(充填剤:ODSシリカゲル、メタノールと水の比率が1:1の溶媒)に付し、2-1画分(TD-1〜8を含有)、2-2画分(TD-11および14を含有)、2-3画分(TD-9および10を含有)、2-4画分(TD-12および13を含有)のそれぞれを得た。順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいては固定相であるシリカゲルへの吸着力の差により、逆相ODSシリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいては、オクタデシル基でシリカゲル表面を置換したものを充填剤として使用し、それにより固定相(ODSシリカゲル)と移動相(溶媒)への分配作用を利用して、上記4つの画分を分離した。

2-1画分〜2-4画分のそれぞれについて下記の処理を行い、各TD化合物を単離した。

[0035] 2-1画分/ TD-1、2、4および5の単離

2-1画分の一部を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルムとアセトンとの比率が9:1、49:1の溶媒)、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(アセトニトリルと水との比率が2:3の溶媒)、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(メタノールと水との比率が11:9の溶媒)、逆相シリカゲルカラムを装着した高速液体クロマトグラフィー(HPLC)(メタノールと水との比率が7:3、3:2の溶媒)により、順次精製することにより、

より、TD-1 (28. 0mg)、TD-2 (14. 0mg)、TD-4 (35. 3mg)、TD-5 (13. 0mg) を単離した。

[0036] 2-1画分/TD-3および7の単離

2-1画分の一部を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルムとアセトンとの比率が49:1の溶媒)、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (メタノールと水との比率が11:9の溶媒)、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (アセトニトリルと水との比率が1:2の溶媒) により順次精製することにより、TD-3 (56. 2mg) およびTD-7 (50. 0mg) を単離した。

[0037] 2-1画分/TD-6および8の単離

2-1画分の一部を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルムとアセトンの比率が49:1、19:1の溶媒)、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (メタノールと水との比率が3:2の溶媒)、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (アセトニトリルと水との比率が1:2の溶媒) により順次精製することにより、TD-6 (14. 0mg) およびTD-8 (8. 7mg) を単離した。

[0038] 2-3画分/TD-9および10の単離

2-3画分を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルムとアセトンとの比率が19:1、4:1、2:1の溶媒)、順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサンとアセトンとの比率が9:1、7:3の溶媒)、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (アセトニトリルと水との比率が9:1、4:1、3:1、2:1、1:1の溶媒) により順次精製することにより、TD-9 (8. 4mg) およびTD-10 (7. 8mg) を単離した。

[0039] 2-2画分/TD-11および14の単離

2-2画分を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルムとアセトンとの比率が49:1の溶媒)、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (メタノールと水の比率が1:1の溶媒)、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (アセトニトリルと水の比率が3:1、5:8、1:2の溶媒) により順次精製することにより、TD-11 (67. 9mg) およびTD-14 (8. 7mg) を単離した。

[0040] 2-4画分/TD-12および13の単離

2-4画分を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルムとアセトンとの比率

が4:1, 3:2の溶媒)、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(メタノールと水の比率が1:1の溶媒)、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(アセトニトリルと水の比率が1:2, 1:1, 2:1の溶媒)により順次精製することにより、TD-12(18.8mg)およびTD-13(60.8mg)を単離した。

[0041] TD-1~14の構造決定

上記で得られたTD-1~TD-14の構造を決定した。

(1) 新規化合物の構造決定

新規化合物質であるTD-3、TD-5およびTD-6は下記のスペクトルデータ等により構造を決定した。

[0042] TD-3(C₂₀H₃₀O₇)

(1S, 3R, 4S, 6R, 7S, 8R, 10R)-1-hydroxy-3-methoxy-3, 10-epoxy-8-isobutyryloxygermacra-11(13)-en-6, 12-olide

1) 性状: 白色粉末 $[\alpha]_D^{26}$ -102度(メタノール)

2) HR-ESI-MS m/z: 383.2058 (Calcd for C₂₀H₃₁O₇, 383.2070)

3) UV (メタノール) λ_{\max} (log ϵ): 216 (log ϵ = 3.81)

4) IR (film) cm⁻¹: 3446, 2972, 2933, 1761, 1736, 1460, 1317, 1261, 1194, 1155, 1072, 1007, 984.

5) ¹H-NMR (重クロロホルム) ppm: 6.19 (1H, d, J=3.4 Hz, H-13a), 5.54 (1H, ddd, J=11.4, 5.3, 2.6 Hz, H-8), 5.47 (1H, d, J=2.9 Hz, H-13b), 4.46 (1H, ddd, J=10.6, 6.9, 1.1 Hz, H-6), 4.06 (1H, dd, J=9.5, 8.6 Hz, H-1), 3.92 (1H, m, H-7), 3.10 (3H, s, OMe), 2.49 (1H, dd, J=14.5, 9.5 Hz, H-2b), 2.37 (1H, m, H-2'), 2.06 (1H, m, H-5b), 1.99 (1H, m, H-4), 1.97 (1H, dd, J=14.5, 5.4 Hz, H-9a), 1.81 (1H, dd, J=14.5, 8.6 Hz, H-2a), 1.72 (1H, br d, J=13.3 Hz, H-5a), 1.63 (1H, dd, J=14.5, 11.4 Hz, H-9b), 1.37 (3H, s, Me-14), 1.01 and 0.99 (each 3H, d, J=7.0 Hz, Me-3' and Me-4'), 0.99 (3H, d, J=7.0 Hz, Me-15).

6) ¹³C-NMR (重クロロホルム) ppm: 79.7 (C-1), 41.7 (C-2), 108.8 (C-3), 46.4 (C-4), 38.2 (C-5), 82.3 (C-6), 48.2 (C-7), 70.2 (C-8), 35.1 (C-9), 81.3 (C-10), 137.7 (C-11), 169.8 (C-12), 121.7 (C-13), 24.1 (C-14), 18.3 (C-15), 176.7 (C-1'),

34.5 (C-2'), 19.1 (C-3' or C-4'), 19.6 (C-3' and C-4'), 49.2 (OMe).

[0043] TD-5(C₁₃H₂₂O₃)

(4S, 5R)-4-hydroxy-4-[(1E, 3S)-3-hydroxy-1-butenyl]-3, 3, 5-trimethyl-cyclohexanone)

1) 性状: 白色粉末 $[\alpha]_D^{26}$ -8度 (メタノール)

2) HR-ESI-MS m/z: 227.1050 (Calcd for C₁₃H₂₂O₃, 227.1647)

3) IR (film) cm⁻¹: 3415, 2968, 11900, 2877, 1695, 1454, 1412, 1369, 1286, 1140, 1061, 1030, 977, 939.

4) ¹H-NMR (重クロロホルム) ppm: 2.77 (1H, d, J=13.6 Hz, H-2ax), 1.84 (1H, dd, J=13.6, 2.2 Hz, H-2ax), 2.35 (1H, t-like, J=12.9 Hz, H-4ax), 2.13 (1H, ddd, J=13.6, 4.5, 2.2 Hz, H-4eq), 2.19 (1H, ddq, J=12.9, 6.5, 4.5 Hz, H-5), 5.63 (1H, dd, J=15.8, 0.8 Hz, H-7), 5.77 (1H, dd, J=15.8, 5.7 Hz, H-8), 4.36 (1H, ddd, J=6.4, 5.7, 0.8 Hz, H-9), 1.25 (3H, d, J=6.4 Hz, Me-10), 0.87 (3H, s, Me-11), 0.90 (3H, s, Me-12), 0.81 (3H, d, J=6.5 Hz, Me-13).

5) ¹³C-NMR (重クロロホルム) ppm: 42.5 (C-1), 51.4 (C-2), 211.4 (C-3), 45.1 (C-4), 36.4 (C-5), 77.0 (C-6), 131.8 (C-7), 135.2 (C-8), 68.3 (C-9), 23.9 (C-10), 24.5 (C-11), 24.4 (C-12), 15.9 (C-13).

[0044] TD-6(C₂₀H₂₈O₇)

(1S, 3R, 6R, 7R, 8R, 10R)-1-hydroxy-3-methoxy-3, 10-epoxy-8-isobutyryloxygermacra-4, 11(13)-dien-6, 12-olide

1) 性状: 白色粉末 $[\alpha]_D^{26}$ -110度 (メタノール)

2) HR-ESI-MS m/z: 381.1947 (Calcd for C₂₀H₂₈O₇, 381.1913)

3) UV (メタノール) λ_{max} (log ϵ): 213 (log ϵ = 3.88)

4) IR (film) cm⁻¹: 3421, 2972, 1763, 1732, 1587, 1282, 1186, 1111, 1064, 991

5) ¹H-NMR (重クロロホルム) ppm: 6.20 (1H, d, J=2.8 Hz, H-13a), 5.66 (1H, m, H-5), 5.59 (1H, ddd, J=11.2, 5.0, 4.6 Hz, H-8), 5.55 (1H, d, J=2.3 Hz, H-13b), 5.20 (1H, m, H-6), 4.16 (1H, m, H-7), 3.77 (1H, dd, J=11.1, 3.9 Hz, H-1), 3.11 (3H, s, OMe), 2.91 (1H, br d, J=11.3 Hz, H-2b), 2.34 (1H, m, H-2'), 2.31 (1H, m,

H-2a), 1.82 (1H, dd, J=14.1, 5.0 Hz, H-9a), 1.70 (3H, t-like, J=1.8 Hz, Me-15), 1.66 (1H, dd, J=14.1, 11.2 Hz, H-9b), 1.44 (3H, s, Me-14), 1.00 (3H, d, J=7.1 Hz, Me-3' or Me-4'), 0.97 (3H, d, J=7.2 Hz, Me-3' or Me-4').

6) ^{13}C -NMR (重クロロホルム) ppm: 77.1 (C-1), 45.2 (C-2), 109.7 (C-3), 138.4 (C-4), 131.2 (C-5), 75.8 (C-6), 49.6 (C-7), 71.2 (C-8), 39.7 (C-9), 87.5 (C-10), 136.2 (C-11), 169.5 (C-12), 122.7 (C-13), 20.8 (C-14), 21.6 (C-15), 175.9 (C-1'), 334.0 (C-2'), 18.6 (C-3' or C-4'), 19.0 (C-3' or C-4'), 50.1 (OMe).

[0045] (2) 既知化合物の構造決定

A) TD-1、TD-2、TD-4、TD-7、TD-8、TD-9、TD-10は既知化合物であり、各種スペクトルデータを上記した技術文献1～13の記載内容に基づいてこれらの構造を決定した。具体的には下記の通りであった。

TD-1

(1R, 3R, 6R, 7R, 8R, 10R)-1, 3-dimethoxy-3, 10-epoxy-8-isobutyryloxygermacra-4, 11(13)-dien-6, 12-olide

TD-2

(6S, 7R, 8R, 10R)-10-hydroxy-3-oxo-8-isobutyryloxygermacra-1, 4, 11(13)-trien-6, 12-olide

TD-4

(1R, 3R, 6R, 7R, 8R, 10R)-3-hydroxy-1-methoxy-3, 10-epoxy-8-isobutyryloxygermacra-4, 11(13)-dien-6, 12-olide

TD-7

(1S, 3R, 4S, 6R, 7S, 8R, 10R)-1, 3-dihydroxy-3, 10-epoxy-8-isobutyryloxygermacra-11(13)-en-6, 12-olide

TD-8

(1R, 3S, 6S, 7R, 8R, 10R)-3-hydroxy-1, 10-epoxy-8-isobutyrylgermacra-4, 11(13)-dien-6, 12-olide

TD-9

(3R, 4S, 6R, 7S, 8R, 10S)-3-hydroxy-3, 10-epoxy-8-isobutyryloxy

germacra-11(13)-en-6, 12-olide

TD-10

(3R, 4S, 6R, 7S, 8R, 10S)-3-methoxy-3, 10-epoxy-8-isobutyryloxy
germacra-11(13)-en-6, 12-olide

[0046] B) TD-11～14は既知化合物であり、各種スペクトルデータを上記した技術文献10～13の記載内容に基づいてこれらの構造を決定した。具体的には下記の通りであった。

TD-11(一般名:タギチニンF)

(3R, 6R, 7R, 8R, 10R)-3-hydroxy-3, 10-epoxy-8-isobutyryloxygerma
cra-1, 4, 11(13)-trien-6, 12-olide

TD-12(一般名:ルテオリン)

3', 4' 5, 7-tetrahydroxy-flavone

TD-13(一般名:ネペチン)

3', 4', 5, 7-tetrahydroxy-6-methoxy-flavone

TD-14

7a, 10a-dihydroxy-3-oxo-8b-isobutyryloxyguaia-11(13)-en-12, 6a
-olide

[0047] 評価試験

評価試験1:TD-1～10の評価試験

TD-1～10の抗癌作用を、ヒト急性骨髄性白血病細胞株HL-60を用いた細胞毒性活性の数値により検討した。具体的には下記の通りに試験した。

FBS含有RPMI1640培地中で前培養したHL-60細胞数を1mL中 4×10^4 個となるようにFBS含有RPMI1640培地に懸濁させ、懸濁液を96-wellマイクロプレートの各wellに196μLずつ分注し、37℃、5%炭酸ガス中、24時間プレインキュベートした。続いて、コントロールとしてEtOH-H₂O(1:1)、サンプルとして各TD化合物をEtOH-H₂O(1:1)に溶解したものを各々4mLずつ各wellに添加した。37℃、5%炭酸ガス中、72時間インキュベートした後、MTT試薬を10mLずつ各wellに添加し、さらに4時間インキュベートした。培地を除去した後、生成したMTTホルマザンを

175mLDMSOに溶解させ、マイクロプレートリーダーを用いて、吸光波長550nmで検出して、コントロールに対する生細胞数を算出した。IC₅₀値は用量-作用曲線から算出した。

TD-1〜10のIC₅₀値(μ g/mL)は下記の表1の通りであった。

[0048] 表1

化合物	IC ₅₀ 値(μ g/mL)
TD-1	(0.60)
TD-2	(0.38)
TD-3	(4.97)
TD-4	(0.05)
TD-6	(2.50)
TD-7	(3.87)
TD-8	(0.92)
TD-9	(2.50)
TD-10	(0.78)

[0049] 評価試験2: TD-1の評価試験(抗癌性試験)

TD-1の抗癌性を調べるために、ヒト培養癌細胞パネルスクリーニング試験を行った。具体的には、ヒト培養がん細胞パネルスクリーニング試験は、「癌と化学療法(矢守隆夫), 24, 129-135, 1997」に記載された方法に準じて、TD-1について全39種のヒト腫瘍細胞に対する50%細胞増殖抑制濃度(GI₅₀)を測定することにより行った。その結果は下記表2に記載する通りであった。

表2

TD-1	GI ₅₀ (μ M)
全39種の癌細胞の平均値	6.8
<u>卵巣癌細胞系</u>	
OVCAR-3	3.3
OVCAR-4	5.6
OVCAR-5	2.9

OVCA-8	3.6
--------	-----

SK-OV-3	4.0
---------	-----

前立腺癌細胞系

DU-145	4.2
--------	-----

PC-3	3.3
------	-----

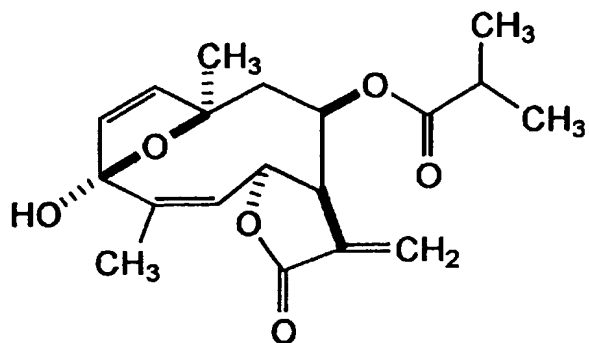
[0050] 評価結果

表2の結果の通り、TD-1は卵巣癌細胞系、前立腺癌細胞系のGI₅₀の値が全39種癌細胞のGI₅₀の平均値より数値が低く、これらの癌細胞系に対して抗癌作用を有することが理解される。

請求の範囲

[1] 下記一般式(I) :

[化1]

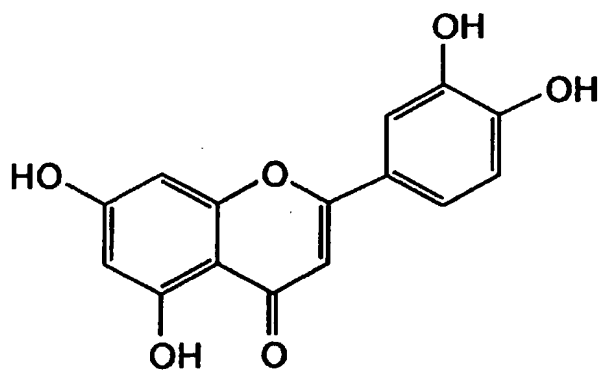


(VI)

[上記式中、R₁は水酸基を示し、R₂はメキシ基を示す]
で表される、化合物。

[2] 下記一般式(II) :

[化2]

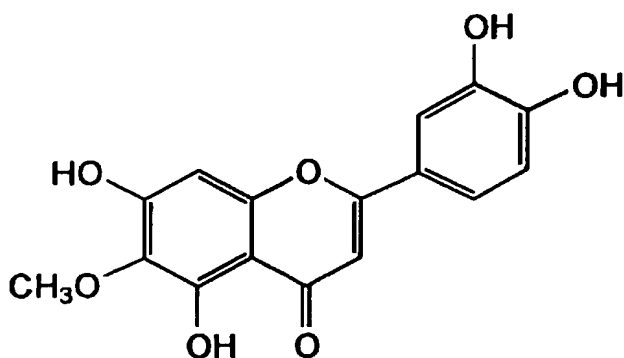


(VII)

[上記式中、R₃は水酸基を示し、R₄はメキシ基を示す]
で表される、化合物。

[3] 下記一般式(III) :

[化3]



(VIII)

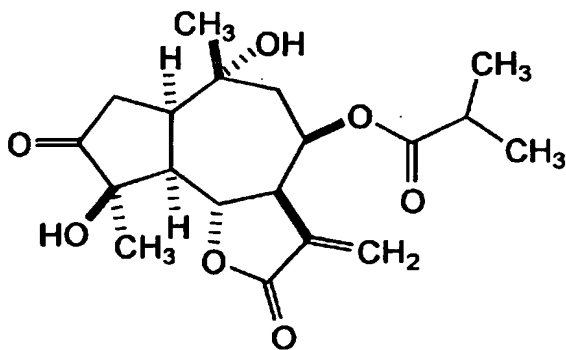
[上記式中、3-ヒドロキシ-1-ブテニル基の3-ヒドロキシ基が3S立体配座とされてなるものである]

で表される、化合物。

- [4] 請求項1または2に記載の化合物を有効成分とする、抗癌剤。
- [5] 動物または人の癌治療に使用される、請求項4に記載の抗癌剤。
- [6] 前記癌が白血病である、請求項4または5に記載の抗癌剤。
- [7] 前記白血病が急性骨髄性白血病である、請求項6に記載の抗癌剤。
- [8] 上記一般式(I)において、 R_1 および R_2 が水酸基を示す化合物、 R_1 が水素原子を示し R_2 が水酸基を示す化合物、 R_1 が水素原子を示し R_2 がメキシ基を示す化合物、
 上記一般式(II)において、 R_3 および R_4 がメキシ基を示す化合物、 R_3 がメキシ基を示し R_4 が水酸基を示す化合物、

下記の一般式(IV)：

[化4]

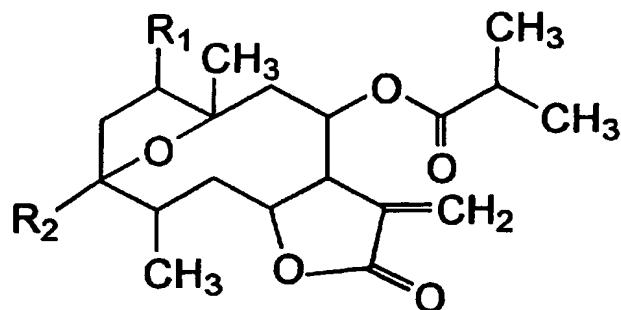


(IX)

で表される化合物、または

下記の一般式(V):

[化5]



(I)

で表される化合物の一種または二種以上の化合物を有効成分とする、抗急性骨髄性白血病剤。

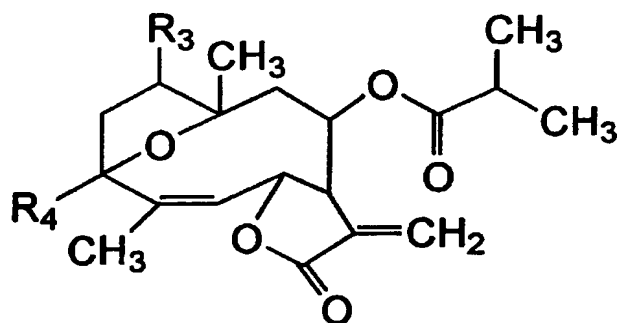
- [9] 動物または人の急性骨髄性白血病治療に使用される、請求項8に記載の抗急性骨髄性白血病剤。
- [10] 請求項1〜3および8に記載された化合物を含んでなる組成物を製造する方法であって、
 前記各化合物を含んでなる原料を用意し、
 必要に応じて加熱下において、前記原料を溶媒で抽出し、
 前記抽出物をイオン交換クロマトグラフィーに供給し、第1の低級アルコールと、第2の低級アルコールと、必要に応じて低級エステルとをこれらの順により溶媒抽出し、
 前記第2の低級アルコール画分中に、前記各化合物を含んでなる組成物を得ることを含んでなる、方法。
- [11] 前記原料がキク科植物またはアカバナ科ショウジャデ属植物である、請求項10に記載の方法。
- [12] 請求項1〜3および8に記載された化合物をそれぞれ得る方法であって、
 前記各化合物を含んでなる組成物を用意し、
 前記組成物をクロマトグラフィーで分離することを複数回繰り返すことにより、前記各化合物をそれぞれ得ることを含んでなる、方法。

- [13] 前記組成物が請求項10または11に記載の方法で得られたものである、請求項12に記載の方法。
- [14] 請求項1〜3および8に記載された化合物を含んでなる組成物を第1の組成物と第2の組成物とに分離する方法であって、
前記各化合物を含んでなる組成物を用意し、
前記組成物を順相クロマトグラフィー、次いで逆相クロマトグラフィーで分離し、第1の組成物と第2の組成物とに分離するものであり、
第1の組成物が請求項1〜3に記載された化合物と、上記一般式(I)において R_1 および R_2 が水酸基を示す化合物と、上記一般式(IV)で表される化合物と、上記一般式(V)で表される化合物とを含んでなるものであり、
第2の組成物が上記一般式(I)において、 R_1 が水素原子を示し R_2 が水酸基を示す化合物と、 R_1 が水素原子を示し R_2 がメキシ基を示す化合物とを含んでなるものである、方法。
- [15] 前記組成物が請求項10または11に記載の方法で得られたものである、請求項14に記載の方法。
- [16] 請求項1〜3に記載された化合物と、上記一般式(I)において R_1 および R_2 が水酸基を示す化合物と、上記一般式(IV)で表される化合物と、上記一般式(V)で表される化合物とをそれぞれ得る方法であって、
前記各化合物を含んでなる組成物を用意し、
前記組成物を順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィーまたはこれらを組合せたもので分離し、前記各化合物を単離することを含んでなる、方法。
- [17] 前記組成物が請求項14または15に記載の方法で得られた第1の組成物である、請求項16に記載の方法。
- [18] 上記一般式(I)において、 R_1 が水素原子を示し R_2 が水酸基を示す化合物と、 R_1 が水素原子を示し R_2 がメキシ基を示す化合物とをそれぞれ得る方法であって、
前記各化合物を含んでなる組成物を用意し、
前記組成物を順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、またはこれらを組合

せたもので分離し、前記各化合物を単離することを含んでなる、方法。

- [19] 前記組成物が請求項14または15に記載の方法で得られた第2の組成物である、請求項18に記載の方法。
- [20] 請求項12～19のいずれか一項に記載の方法で得られた、請求項1～3および8に記載された各化合物。
- [21] 上記一般式(II)において、 R_3 および R_4 がメキシ基を示す化合物を有効成分とする、抗卵巣癌剤。
- [22] 動物または人の卵巣癌の治療に使用される、請求項21に記載の抗卵巣癌剤。
- [23] 上記一般式(II)において、 R_3 および R_4 がメキシ基を示す化合物を有効成分とする、抗前立腺癌剤。
- [24] 動物または人の前立腺癌の治療に使用される、請求項21に記載の抗前立腺癌剤。
- [25] 下記一般式(VI)：

[化6]

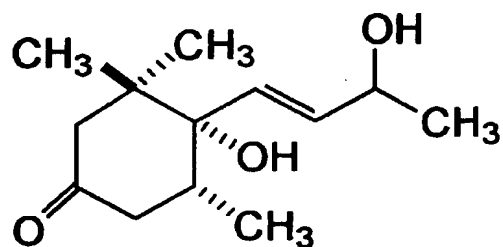


(II)

で表される化合物と、

下記の一般式(VII)：

[化7]

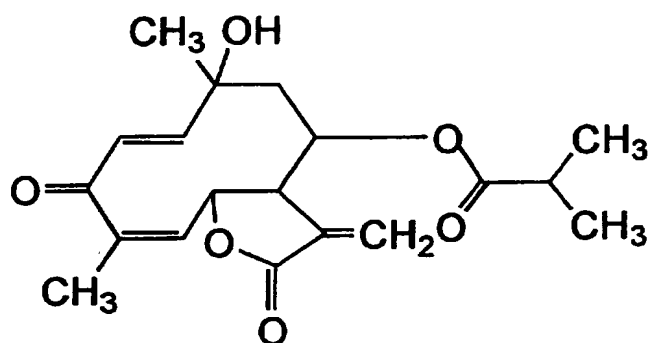


(III)

で表される化合物と、

下記の一般式(VIII):

[178]

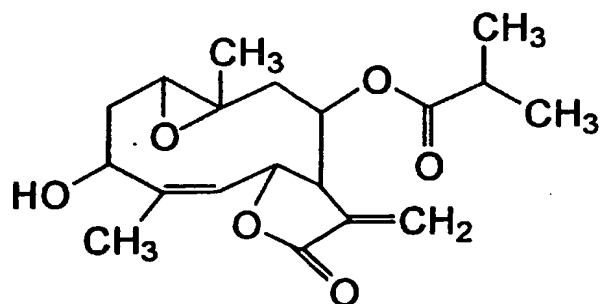


(IV)

で表される化合物と、

下記の一般式(IX):

[化9]



(v)

で表される化合物とを含んでなる組成物を製造する方法であって、

前記各化合物を含んでなる原料を用意し、

必要に応じて加熱下において、前記原料を溶媒で抽出し、

前記抽出物をイオン交換クロマトグラフィーに供給し、第1の低級アルコールと、第2の低級アルコールと、必要に応じて低級エステルとをこれらの順により溶媒抽出し、

前記第2の低級アルコール画分中に、前記各化合物を含んでなる組成物を得ることを含んでなる、方法。

[26] 前記原料がキク科植物またはアカバナ科チョウジタデ属植物である、請求項25に記載の方法。

[27] 上記一般式(VI)〜(IX)で表される化合物をそれぞれ得る方法であって、
前記各化合物を含んでなる組成物を用意し、
前記組成物をクロマトグラフィーで分離することを複数回繰り返すことにより、前記各化合物をそれぞれ得ることを含んでなる、方法。

[28] 前記組成物が請求項25または26に記載の方法で得られたものである、請求項27に記載の方法。

[29] 上記一般式(VI)〜(IX)で表される化合物を含んでなる組成物を第3の組成物と第4の組成物とに分離する方法であって、

前記各化合物を含んでなる組成物を用意し、

前記組成物を順相クロマトグラフィー、次いで逆相クロマトグラフィーで分離し、第3の組成物と第4の組成物とに分離するものであり、

第3の組成物が上記一般式(VI)で表される化合物と、上記一般式(IX)で表される化合物とを含んでなるものであり、

第4の組成物が上記一般式(VII)で表される化合物と、上記一般式(VIII)で表される化合物とを含んでなるものである、方法。

[30] 前記組成物が請求項25または26に記載の方法で得られたものである、請求項29に記載の方法。

[31] 上記一般式(VI)で表される化合物と、上記一般式(IX)で表される化合物とをそれぞれ得る方法であって、

前記各化合物を含んでなる組成物を用意し、

前記組成物を順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィーまたはこれらを組合せたもので分離し、前記各化合物を単離することを含んでなる、方法。

[32] 前記組成物が請求項29または30に記載の方法で得られた第3の組成物である、請求項31に記載の方法。

[33] 上記一般式(VII)で表される化合物と、上記一般式(VIII)で表される化合物とをそれぞれ得る方法であって、

前記各化合物を含んでなる組成物を用意し、

前記組成物を順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィーまたはこれらを組合せたもので分離し、前記各化合物を単離することを含んでなる、方法。

[34] 前記組成物が請求項29または30に記載の方法で得られた第4の組成物である、請求項33に記載の方法。

[35] 請求項27〜34のいずれか一項に記載の方法で得られた、上記一般式(VI)〜(IX)で表された各化合物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017480

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07D493/18, C07D493/04, C07D311/30, C07D307/93, C07C49/743, C07C45/80, A61K31/365, A61K31/352, A61K31/343, A61K35/78, A61P35/00, A61P35/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07D493/18, A61K31/365, A61K35/78, A61P35/00, A61P35/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Paulo Sergio PEREIRA et al., Sesquiterpene Lactones from Brazilian <i>Tithonia Diversifolia</i> , Phytochemistry, 1997, 45, pages 1445 to 1448	2 1, 4-7
A	Raghendra PAL et al., Chemical Constituents of <i>Tithonia tagitiflora</i> Desf.: Part III-Constitution of Tagitinin-A, Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemical Including Medicinal Chemistry, 1976, 14B, pages 259 to 262	1, 2, 4-7
A	Raghendra PAL et al., Chemical Constituents of <i>Tithonia tagitiflora</i> Desf.: Part IV-Tagitinin-C, D & F, Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemical Including Medicinal Chemistry, 1977, 15B, pages 208 to 211	1, 2, 4-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 March, 2005 (15.03.05)

Date of mailing of the international search report
05 April, 2005 (05.04.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017480

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Baruah Nabin C. et al., Sesquiterpene Lactones of <i>Tithonia diversifolia</i> . Stereochemistry of the Tagitinins and Related Compounds, Journal of Organic Chemistry, 1979, 44, pages 1831 to 1835	1, 2, 4-7
A	Raghwendra PAL et al., Antileukemic and Other Constituents of <i>Tithonia Tagitiflora</i> Desf., Journal of Pharmaceutical Sciences, 1976, 65, 6, pages 918 to 920	1, 2, 4-7
A	JP 2-264722 A (Tsumura & Co.), 29 October, 1990 (29.10.90), (Family: none)	1, 2, 4-7
E, X	Ryosuke KOBAYASHI et al., "Kikuka Shokubutsu <i>Tithonia diversifolia</i> (Nitobegiku) no Sesquiterpenoid Seibun ni Tsuite", Nippon Yakugakukai Nenkai Koen Yoshishu, 05 March, 2004 (05.03.04), 124th, 2, page 139	1, 2, 4-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017480

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1, 2, and 4-7

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017480

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

In each claim of this application, each compound number given in the sentence does not coincide with the number given in the succeeding chemical formula. Thus, a judgment was made on the assumption that the chemical formula corresponding to the number used in the sentence is given in each claim.

For example, in claim 1, "compound (VI)" is given as [Chemical formula 1] succeeding "the following general formula (I):." However, the [Chemical formula 1] was actually regarded not as compound (VI) but as compound (I) (description, page 1).

The compounds (I) and (II) in the invention group relating to claims 1, 2, and 4-7 (invention group (1)) and the compound (III) in the invention relating to claim 3 (invention group (2)) do not have a chemical structure common therebetween. There is hence no special technical feature common between the two invention groups.

A matter common between the compounds represented by the formulae (I) and (II) given in claims 8, 9, and 21-24 (invention group (3)) and the compounds in the invention group (1) is considered to be the basic skeleton of the compound (I). However, compounds having such basic skeleton are known as apparent from the fact that they are described in the following documents 1 to 4. This point cannot hence be regarded as a special technical feature which contributes to the prior art.

A matter common between the compounds in the invention group (1) and each of the compound (IV) (invention group (4)) and compound (V) (invention group (5)) given in claims 8, 9, and 21-24 is considered to be part of the basic skeleton of the compound (I). However, compounds having such basic skeleton are known as apparent from the fact that they are described in the following documents 1 to 4. This point cannot hence be regarded as a special technical feature which contributes to the prior art.

The invention group relating to claims 10 and 11 (invention group (6)) is a process for producing a composition containing the compounds given in claims 1-3 and 8. However, this production process is a method by which raw materials containing the compounds are extracted and fractionated to finally obtain a mixture of these compounds. This process can hence be regarded as neither a process for producing the compound of claim 1 nor a process for producing a composition using the isolated compound of claim 1.

Therefore, the invention group (6), which relates to claims 10 and 11, has no special technical feature common with the invention group (1).

The invention group relating to claims 12 and 13 (invention group (7)) is methods of respectively obtaining the compounds given in claims 1-3 and 8. However, these methods each is a method of continuously separating the compounds through a series of operations from a composition comprising the compounds, which have no novel common skeleton as stated above. The invention group (7) hence has no special technical feature common with the invention group (1).

(continued to next sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017480

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(3)

The invention group relating to claims 14 and 15 (invention group (8)) is a method of separating the compounds given in claims 1-3 and 8 into a first composition and a second composition. However, this production process is a method in which a composition comprising the compounds is fractionated to obtain two mixtures of these compounds. This method can hence be regarded as neither a process for producing the compound of claim 1 nor a process for producing a composition using the isolated compound of claim 1.

Therefore, the invention group (8), which relates to claims 14 and 15, has no special technical feature common with the invention group (1).

The invention group relating to claims 16 and 17 (invention group (9)) is methods of respectively obtaining the compounds given in part of claims 1-3 and 8. However, these methods each is a method of continuously separating the compounds through a series of operations from a composition comprising the compounds, which have no novel common skeleton as stated above. The invention group (9) hence has no special technical feature common with the invention group (1).

In claim 20, the compounds described in claims 1 and 2, the compound described in claim 3, and the compound described in claim 8 are included in the invention group (1), invention group (2), and invention group (3), respectively. As stated above, there is no matter which is common among these invention groups and is regarded as a technical feature contributing to the prior art.

A matter common between the invention group relating to claims 25 and 26 (invention group (11)) and the invention group (1) is considered to be the basic skeleton. However, compounds having the common structure are known as apparent from the fact that they are described in document 2 shown below. This point cannot hence be considered to be a special technical feature which contributes to the prior art.

The invention group relating to claims 27 and 28 (invention group (12)) is methods of respectively obtaining compounds (VI) to (IX); the invention group relating to claims 29 and 30 (invention group (13)) is a method of separating an unspecified composition comprising the compounds (VI) to (IX) into a third composition and a fourth composition; the invention group relating to claims 31 and 32 (invention group (14)) is methods of respectively obtaining the compounds (VI) and (IX); and the invention group relating to claims 33 and 34 (invention group (15)) is methods of respectively obtaining the compounds (VII) and (VIII). However, for the same reasons as those shown for the invention groups (6) to (10), the invention groups (12) to (15) each has no special technical feature common with the invention group (1).

A matter common between the compound (VI) given in claim 35 (invention group (16)) and the compounds in the invention group (1) is considered to be the basic skeleton of the compound (I). However, compounds having such basic skeleton are known as apparent from the fact that they are described in the following documents 1 to 4. This point cannot hence be regarded as a special technical feature which contributes to the prior art.

(continued to next sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017480

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(4)

Furthermore, neither the compounds (VII) and (VIII) (invention group (17)) nor the compound (IX) (invention group (18)) described in claim 35 has any chemical structure common with the compounds of the invention group (1). There is hence no special technical feature common between the invention group (17) or (18) and the invention group (1).

From the above, the invention groups (1) to (18) are not considered to be so linked to one another as to form a single general inventive concept.

Document 1: Raghwendra Pal, et al., *Indian Journal of Chemistry*, Section B: Organic Chemical Including Medicinal Chemistry, 1976, 14B, pp.259-262

Document 2: Raghwendra Pal, et al., *Indian Journal of Chemistry*, Section B: Organic Chemical Including Medicinal Chemistry, 1977, 15B, pp.208-211

Document 3: Paulo Sergio Pereira, et al., *Phytochemistry*, 1997, 45, pp.1445-1448

Document 4: Baruah Nabin C., et al., *Journal of Organic Chemistry*, 1979, 44, pp.1831-1835

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07D 493/18, C07D 493/04, C07D 311/30, C07D 307/93, C07C 49/743, C07C 45/80, A61K 31/365, A61K 31/352, A61K 31/343, A61K 35/78, A61P 35/00, A61P 35/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07D 493/18, A61K 31/365, A61K 35/78, A61P 35/00, A61P 35/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	Paulo Sergio PEREIRA, et al, Sesquiterpene Lactones from Brazilian <i>Tithonia Diversifolia</i> , Phytochemistry, 1997, 45, p. 1445-1448	2 1、4 - 7
A	Raghwendra PAL et al, Chemical Constituents of <i>Tithonia tagitiflora</i> Desf.: Part III-Constitution of Tagitinin-A, Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemical Including Medicinal Chemistry, 1976, 14B, p. 259-262	1、2、4 - 7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 03. 2005

国際調査報告の発送日

05. 4. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小堀 麻子

4 C

3336

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Raghwendra PAL et al, Chemical Constituents of <i>Tithonia tagitiflora</i> Desf.: Part IV-Tagitinin-C, D & F, Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemical Including Medicinal Chemistry, 1977, 15B, p.208-211	1、2、4－ 7
A	Baruah Nabin C. et al, Sesquiterpene Lactones of <i>Tithonia diversifolia</i> . Stereochemistry of the Tagitinins and Related Compounds, Journal of Organic Chemistry, 1979, 44, p.1831-1835	1、2、4－ 7
A	Raghwendra PAL et al, Antileukemic and Other Constituents of <i>Tithonia tagitiflora</i> Desf., Journal of Pharmaceutical Sciences, 1976, 65, 6, p.918-920	1、2、4－ 7
A	J P 2-264722 A (株式会社ツムラ) 1990. 10. 29, (ファミリーなし)	1、2、4－ 7
EX	小林亮介他, キク科植物 <i>Tithonia diversifolia</i> (ニトベギク) のセスキテルペノイド成分について, 日本薬学会年会講演要旨集, 2004. 03. 05, 124th, 2, p. 139	1、2、4－ 7

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲 1, 2, 4-7

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

本願各請求の範囲においては、文章中に記載された化合物の番号と、それに続く化学式中の番号が一致していないので、各請求の範囲には、文章中に記載された番号に相当する化学式が記載されているものと認定して判断を行った。

例えば、請求の範囲1には「下記一般式(I):」に続く[化1]として化合物(VI)が記載されているが、実際には[化1]としては化合物(VI)ではなく化合物(I) (明細書第1頁)が記載されているものとみなした。

請求の範囲1、2、4-7に係る発明群(発明群①)における化合物(I)、(II)と、請求の範囲3に係る発明(発明群②)における化合物(III)は、共通の化学構造を有するものではなく、両発明群の間には共通の特別な技術的特徴は何ら存在しない。

請求の範囲8、9、21-24に記載された式(I)、(II)で表される化合物(発明群③)と、発明群①における化合物とは、化合物(I)の基本骨格において共通するものと認められるが、当該基本骨格を有する化合物は下記文献1-4に記載されるとおり公知であるから、この点を先行技術に対して貢献する特別な技術的特徴と認めることはできない。

また、請求の範囲8、9、21-24に記載された化合物(IV)(発明群④)及び化合物(V)(発明群⑤)はそれぞれ、発明群①における化合物と、化合物(I)の基本骨格の一部において共通するものと認められるが、当該基本骨格を有する化合物は下記文献1-4に記載されるとおり公知であるから、この点を先行技術に対して貢献する特別な技術的特徴と認めることはできない。

請求の範囲10、11に係る発明群(発明群⑥)は、請求項1-3および8に記載された化合物を含んでなる組成物を製造する方法であるが、当該製法は各化合物を含む原料を抽出、分画し、最終的にはそれら化合物の混合物を得る方法であるから、請求項1記載の化合物を生産する方法とも、請求項1記載の単離された化合物を用いて組成物を製造する方法とも認められない。

したがって、請求の範囲10、11に係る発明群⑥は、発明群①と特別な技術的特徴を共有していない。

請求の範囲12、13に係る発明群(発明群⑦)は、請求項1-3および8に記載された化合物をそれぞれ得る方法であるが、当該方法は上記のとおり新規な共通骨格を有しない各化合物を含む組成物から一連の操作で連続的に化合物を分離する方法であり、発明群①と特別な技術的特徴を共有していない。

請求の範囲14、15に係る発明群(発明群⑧)は、請求項1-3および8に記載された化合物を第1の組成物と第2の組成物とに分離する方法であるが、当該製法は各化合物を含む組成物を分画し、それら化合物の混合物を2種類得る方法であるから、当該方法は請求項1記載の化合物を生産する方法とも、請求項1記載の単離された化合物を用いて組成物を製造する方法とも認められない。

したがって、請求の範囲14、15に係る発明群⑧は、発明群①と特別な技術的特徴を共有していない。

請求の範囲16、17に係る発明群(発明群⑨)は、請求項1-3および8の一部に記載された化合物をそれぞれ得る方法であるが、当該方法は上記のとおり新規な共通骨格を有しない各化合物を含む組成物から一連の操作で連続的に化合物を分離する方法であり、発明群①と特別な技術的特徴を共有していない。

請求の範囲 20 における請求項 1、2 に記載された化合物群は発明群①に、請求項 3 に記載された化合物は発明群②に、請求項 8 に記載された化合物は発明群③に包含され、各発明群の間には先行技術に対して貢献する技術的特徴と考えられる共通の事項は存在しないことは上記のとおりである。

請求の範囲 25、26 に係る発明群（発明群⑪）と、発明群①は、その基本骨格において共通すると認められるが、当該共通の構造を有する化合物は下記文献 2 に記載されるとおり公知であるから、この点を先行技術に対して貢献する特別な技術的特徴と認めることはできない。

請求の範囲 27、28 に係る発明群（発明群⑫）は、化合物(VI)～(IX)をそれぞれ得る方法、請求の範囲 29、30 に係る発明群（発明群⑬）は、化合物(VI)～(IX)を含む不特定の組成物を第三の組成物と第四の組成物とに分離する方法、請求の範囲 31、32 に係る発明群（発明群⑭）は、化合物(VI)、(IX)をそれぞれ得る方法、請求の範囲 33、34 に係る発明群（発明群⑮）は、化合物(VII)、(VIII)をそれぞれ得る方法であるが、上記発明群⑥～⑩について示したと同様の理由により、発明群⑫～⑮はそれぞれ、発明群①と特別な技術的特徴を共有していない。

請求の範囲 35 に記載された化合物(VI)（発明群⑯）と、発明群①における化合物とは、化合物(I)の基本骨格において共通するものと認められるが、当該基本骨格を有する化合物は下記文献 1～4 に記載されるとおり公知であるから、この点を先行技術に対して貢献する特別な技術的特徴と認めることはできない。

また、同請求の範囲 35 記載の化合物(VII)、(VIII)（発明群⑰）、及び、化合物(IX)（発明群⑱）は、それぞれ発明群①における化合物と共通の化学構造を有するものではないから、発明群⑰又は⑱と発明群①との間には、共通の特別な技術的特徴は何ら存在しない。

以上より、発明群①～⑱は、互いに単一の一般的発明概念を形成するように連関しているとは認められない。

文献 1 : Raghwendra Pal, et al. Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemical Including Medicinal Chemistry, 1976, 14B, p. 259-262

文献 2 : Raghwendra Pal, et al. Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemical Including Medicinal Chemistry, 1977, 15B, p. 208-211

文献 3 : Paulo Sergio Pereira, et al. Phytochemistry, 1997, 45, p. 1445-1448

文献 4 : Baruah Nabin C., et al. Journal of Organic Chemistry, 1979, 44, p. 1831-1835